

SUPEREXPRESSION DO ANTÍGENO 85B DE *Mycobacterium bovis* EM BCG Pasteur *leuD* E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL EM CAMUNDONGOS

**RIZZI, Caroline¹; LEAL, Karen S.¹; STURBELLE, Régis²; SÁ, Gizele Lima de²;
LEAL, Fernanda²; DELLAGOSTIN, Odir Antônio³**

¹Laboratório de Biologia Molecular – ccrizzi@yahoo.com.br; ²Laboratório de Imunohistoquímica –
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - UFPel

³Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Desenvolvimento Tecnológico –
UFPel – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) bovina é uma grave patologia que permanece como um importante problema econômico na América Latina, com consequências zoonóticas potenciais. Programas de erradicação diminuíram a prevalência da doença em países desenvolvidos, mas somente estratégias efetivas de vacinação em animais apresentariam impacto nos países que possuem medidas sanitárias incipientes (THOEN *et al.*, 2009).

O sequenciamento do genoma de *Mycobacterium bovis*, agente etiológico da TB bovina, abriu a possibilidade de desenvolvimento de novas vacinas (GARNIER *et al.*, 2003). O antígeno 85B (Ag85B) de *M. bovis*, codificado pelo gene *fbpB*, é o antígeno imunodominante deste bacilo (HORWITZ, 2005). A cepa *M. bovis* Pasteur BCG é um vetor vacinal adequado para a superexpressão de Ag85B, pois apresenta propriedades adjuvantes associadas a sua replicação no interior do hospedeiro (BASTOS *et al.*, 2009).

Em nosso laboratório foi desenvolvido um sistema de expressão empregando um mutante de BCG Pasteur auxotrófico para leucina (BCG Pasteur *leuD*) e um vetor (pUP410) que suplementa esta mutação (BORSUK *et al.*, 2007). Este sistema de complementação auxotrófica permite a produção de cepas recombinantes estáveis *in vivo* com altos níveis de expressão da proteína recombinante, sem a utilização de antibióticos como marcadores de seleção, aumentando a segurança da vacina (BORSUK *et al.*, 2007; SEIXAS *et al.*, 2010).

Este trabalho descreve a produção de cepas BCG Pasteur *leuD* superexpressando Ag85B de *M. bovis* e a avaliação da resposta humoral induzida por estas cepas em camundongos. Estes resultados servirão de base para orientar futuros experimentos de desafio frente a cepas patogênicas de *M. bovis* em bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Baseado na sequência completa do genoma de *M. bovis* AF2122/97, *primers* foram construídos usando o software Vector NTI. Estes *primers* permitiram a amplificação do gene *fbpB* com seu próprio promotor e também de uma versão contendo apenas a região codificadora de *fbpB*, através da reação de PCR. Os produtos da PCR foram clonados no vetor pUP410, conforme descrito

por LEAL *et al.* (2010), originando respectivamente os vetores pUP410::*fbpB* e pUP410::*18fbpB*.

Células de BGC Pasteur *leuD* eletrocompetentes foram transformadas com os vetores recombinantes, e crescidas por 5 dias em meio seletivo (7H9 suplementado com 10% de OADC, 0,2% de Glicerol e 0,05% de Tween 80) contendo ou não 25 µg mL⁻¹ de canamicina. A cultura foi centrifugada, o pellet suspenso em tampão Tris-HCl 50 mM e lisado em ribolizador. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação e, para a visualização da expressão de Ag85B, foi realizado *Western blot* empregando-se anticorpos policlonais de camundongos anti-Ag85B (RIZZI *et al.*, 2010).

Oito grupos de cinco fêmeas de camundongos isogênicos BALB/c, com seis semanas de idade, foram inoculados intraperitonealmente com 10⁷ UFC das construções BCG Pasteur *leuD* + pUP410::*fbpB*, BCG Pasteur *leuD* + pUP410::*18fbpB*, e os controles BCG Pasteur *leuD* + pUP410, BCG Pasteur *leuD* e PBS. Após 20 dias decorridos da primeira inoculação, foi realizada uma inoculação adicional, das bactérias recombinantes ou da proteína Ag85B recombinante (RIZZI *et al.*, 2010). O soro dos animais inoculados foi coletado nos dias 0, 15, 30, 45 e 75 pós-vacinação. O título dos anticorpos IgG séricos foi determinado através de ELISA indireto empregando Ag85B recombinante, conforme descrito por RIZZI *et al.*, (2010) e os resultados analisados empregando-se o teste T de *Student* ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os vetores recombinantes foram construídos com sucesso e digestões com enzimas de restrição confirmaram a presença dos fragmentos inseridos. A expressão da proteína recombinante Ag85B (30 kDa) foi observada nos sobrenadantes e sedimentos celulares de BCG Pasteur $\Delta leuD$ recombinantes (Figuras 1 e 2).

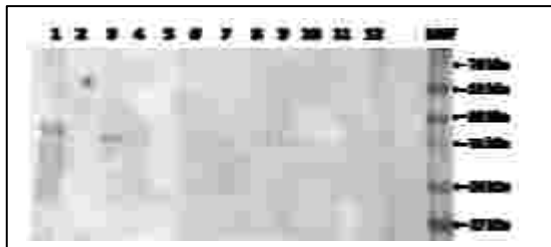


Figura 1: *Western blot* demonstrando a expressão de Ag85B no sobrenadante celular de BCG Pasteur $\Delta leuD$ recombinantes. Coluna 1, Ag85B recombinante; Coluna 2, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410 (controle negativo); Coluna 3, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410::*fbpB*; Colunas 4 a 12, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410::*18fbpB*; MW, Full-Range Rainbow Protein Markers (GE).

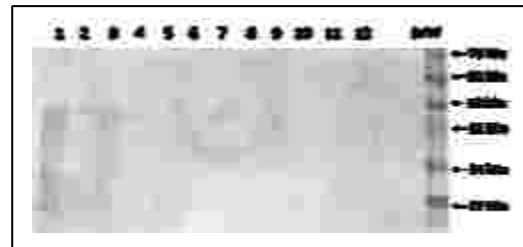


Figura 2: *Western blot* demonstrando a expressão de Ag85B no sedimento celular de BCG Pasteur $\Delta leuD$ recombinantes. Coluna 1, Ag85B recombinante; Coluna 2, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410 (controle negativo); Coluna 3, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410::*fbpB*; Colunas 4 a 12, BCG Pasteur $\Delta leuD$ + pUP410::*18fbpB*; MW, Full-Range Rainbow Protein Markers (GE).

Embora Ag85B é capaz de induzir a produção de anticorpos (OHARA *et al.*, 1993), a resposta humoral das bactérias recombinantes empregando BCG Pasteur $\Delta leuD$ (transformadas com pUP410::*fbpB* ou pUP410::*18fbpB*) não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle (Figura 3). Já os grupos de animais inoculados com os BCG recombinantes que receberam a dose de reforço contendo o Ag85B recombinante apresentaram forte reação em relação aos controles salina e BCG Pasteur *leuD*, mas reação não significativa em relação ao grupo o qual os animais foram vacinados com o controle BCG e Ag85B recombinante (Figura 4).

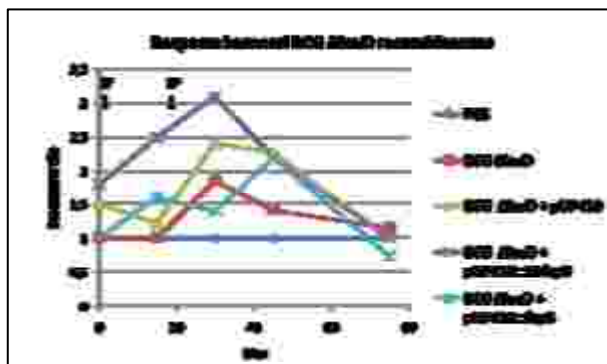


Figura 3: Soroconversão dos anticorpos IgG anti-Ag85B de camundongos inoculados com BCG Pasteur *leuD* recombinantes expressos em unidades de ELISA. IP: imunização intraperitoneal dos animais.

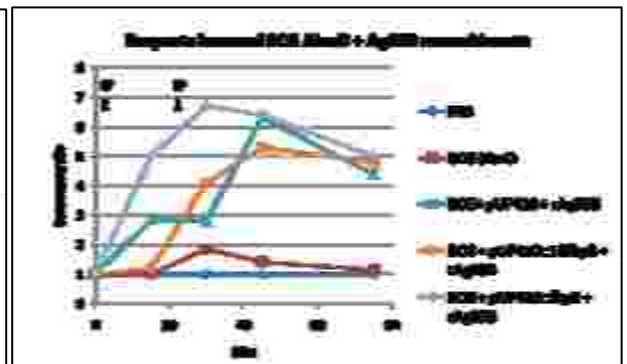


Figura 4: Soroconversão dos anticorpos IgG anti-Ag85B de camundongos inoculados com BCG Pasteur *leuD* recombinantes + Ag85B recombinante expressos em unidades de ELISA. IP: imunização intraperitoneal dos animais.

Embora não houve a indução significativa de anticorpos contra o Ag85B nas cepas que superexpressam este antígeno, é possível que a resposta imune celular tenha sido estimulada de forma diferenciada. Proteção contra tuberculose é mediada principalmente pela resposta imune celular. Este tipo de resposta será avaliada na sequência.

4. CONCLUSÕES

As clonagens do gene *fbpB* e a construção dos BCGs recombinantes foram realizadas com sucesso, já que as proteínas recombinantes foram expressas na fração solúvel e com massa molecular esperada em BCG Pasteur $\Delta leuD$. BCG Pasteur $\Delta leuD$ superexpressando o Ag85B não induziu títulos de anticorpos significativamente superiores que os induzidos pela cepa parental. A indução de resposta imune celular será ainda avaliada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, R.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. Vaccine, v.27, p. 6495-6503.

BORSUK, S.; MENDUM, T.; FAGUNDES, M.Q.; MICHELON, M.; CUNHA, C.W.; MCFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O.A. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v.87, p. 474-480, 2007.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S. T.; GORDON, S.V. HEWINSON, G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.13, p.7877-7882, 2003.

HORWITZ, M.A. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. **Microbes and Infection**, v.7, p.947-954, 2005.

LEAL, K.S.; RIZZI, C.; BIANCO, V.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Construção de um vetor de expressão capaz de produzir Ag85B de *Mycobacterium bovis* em *M. smegmatis* mc² 155. In: **XII ENPOS**, Pelotas, 2010. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2010. v.1.

OHARA, N., MATSUO, K., YAMAGUCHI, A., YAMAKAZI, A., TSAKA, H., YAMADA, T. Cloning and sequencing of the gene for alpha antigen from *Mycobacterium avium* and mapping of B-cell epitopes. **Infection Immunity** v.6 n.4, p.1173-1179, 1993.

RIZZI, C.; LEAL, K.S.; HARTLEBEN, C.P.; HARTLEBEN, J.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Expressão de AG85B de *Mycobacterium bovis* em *Escherichia coli*. In: **XII ENPOS**, Pelotas, 2010. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2010. v.1.

SEIXAS, F.K.; BORSUK, S.; FAGUNDES, M.Q.; HARTWIG, D. SILVA, E.; CERQUEIRA, G. and DELLAGOSTIN, O.A. Stable expression of *Leptospira interrogans* antigens in auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG. **Biological Research**, v.43, p.13-18, 2010.

THOEN, C.O., LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A.; KANEENE, J.B.; KANTOR, I.N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana**, v.45, n.1, p.135-181, 2009.